

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**





**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

<b>(51) Internationale Patentklassifikation<sup>5</sup> :</b> <b>C12N 15/82, 15/83, A01H 5/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 94/26912</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 24. November 1994 (24.11.94)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP94/01408 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 4. Mai 1994 (04.05.94)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 43 15 109.4 6. Mai 1993 (06.05.93) DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZENFORSCHUNG [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> LEISER, Robert-Matthias [DE/DE]; Max-Volmer-Strasse 4, D-40724 Hilden (DE). PLOBNER, Lutz [DE/DE]; Hochdahler Markt 73, D-40699 Erkrath-Hochdahl (DE). MÜNTZ, Klaus [DE/DE]; Quedlinburger Chaussee, D-06466 Gatersleben (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> MEYERS, Hans-Wilhelm; von Kreisler Selting Werner, Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD AND VECTOR CONSTRUCT FOR INCREASING THE EXPRESSION OF TRANSGENES <b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN UND VEKTORKONSTRUKTE ZUR EXPRESSIONSSTEIGERUNG VON TRANSGENEN <b>(57) Abstract</b> <p>In order to increase the expression of transgenes, the invention proposes that at least one specific nucleotide sequence be transferred, after insertion in the vector construct, to the preferably eucaryotic recipient organism and at least part of this nucleotide sequence be transcribed, the resulting transcripts being amplified by an RNA replication system, preferably of phytoviral origin.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Zur Expressionssteigerung von Transgenen wird mindestens eine spezifische Nukleotidsequenz nach Einbau in das Vektorkonstrukt in den vorzugsweise eukaryotischen Rezipientenorganismus transferiert und mindestens ein Teil dieser Nukleotidsequenz transkribiert, wobei die entstehenden Transkripte durch ein RNA-Replikationssystem vorzugsweise phytoviralen Ursprungs amplifiziert werden.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren und Vektorkonstrukte  
zur Expressionssteigerung von Transgenen

Gegenstand des Patents

Gegenstand dieses Patents ist ein Verfahren und die dafür verwendeten Vektorkonstrukte zur Expressionsregulierung von Transgenen in Rezipientenorganismen, vorzugsweise pflanzlichen Rezipienten. Das Verfahren beruht auf der Nutzung des Replikationsmechanismus von RNA-Viren zur Vermehrung gewünschter messenger RNA auf posttranskriptioneller Ebene. Das Fremdgen wird in ein erfindungsgemäßes Konstrukt inseriert, das zusätzlich für eine virale Replikase kodiert oder mit einem weiteren Konstrukt mit dieser Geninformation korrespondiert, wobei diese Konstrukte unter Transkriptionskontrolle eines konstitutiven oder gewebespezifischen bzw. ontogenesespezifischen Promotors stehen und zumindest ein Teil der entstehenden Transkripte von der Virusreplikase als Template wie die homologe Virus-RNA erkannt werden. Die Konstrukte werden in den Rezipienten eingeschleust, gegebenenfalls in das Rezipientengenom integriert und unter Nutzung rezipienten-eigener Transkriptionssysteme transkribiert. Die Expressionsoptimierung wird dadurch erreicht, daß das (eine) Transkript zunächst als Messenger für die

Synthese der Virusreplikase dient. Diese erkennt wiederum zumindestens das für das interessierende Transgen kodierende Transkript als Template für eine vorzugsweise wiederkehrende Replikation, in deren Verlauf es zur posttranskriptionellen Vermehrung des interessierenden Messengers und schließlich zur Translation der gewünschten transgenen Sequenz kommt, sofern es sich bei dem Transgen um eine proteinkodierende Sequenz handelt.

Die Nutzung transgener Organismen hängt in entscheidendem Maße davon ab, ob und wie es gelingt, die Expression des gewünschten Transgens zu regulieren. Sehr häufig ist das Expressionsniveau entscheidend zu niedrig.

Bisher versucht man diese Schwierigkeiten in erster Linie dadurch zu überwinden, daß Möglichkeiten der Erhöhung der Transkriptionsrate, der Erhöhung der Gendosis und z.T. der Erhöhung der Messengerstabilität und Translationseffizienz gesucht werden. In vielen wichtigen Fällen konnte aber der entscheidende Durchbruch in Richtung Hochexpression nicht erzielt werden.

Erforderlich ist deshalb ein System, mit dem eine Expressionserhöhung in sehr viel größerem Umfang als mit den bisherigen (o.g.) Versuchsansätzen erzielbar wird, wobei gleichzeitig angestrebt werden muß, daß sich dieses System bestimmten Regulationsprinzipien des normalen Funktionsapparates der Zelle entziehen kann. Dies kann dadurch erreicht werden, daß das Transgen in das Genom eines geeigneten Virus integriert und während des Replikationsgeschehens wie ein Virusgen in der infizierten Zelle behandelt wird. Der entscheidende Nachteil dieses Ansatzes besteht jedoch darin, daß dieses Expressionssystem nicht stabil gestaltet werden kann. Der Rezipientenorganismus muß zunächst mit dem Chimären-Virus infiziert werden. Hierbei stößt man auf Grenzen, die sich durch den Wirtskreis des Virus und durch seine bevorzugten Replikationsorte im Rezipienten ergeben.

Ein weiterer großer Nachteil besteht darin, daß ein solches System nur schwierig geschlossen gehalten werden kann, d.h. das Chimären-Virus kann sich auf weitere pflanzliche Organismen ausbreiten und eine Kontrolle dieses Vorganges ist nur schwer zu realisieren.

Mit der vorliegenden Erfindung werden alle diese Nachteile eines Expressionssystems auf der Basis eines viralen Replikationsapparates durch gezielte Maßnahmen überwunden.

Das erfindungsgemäße Verfahren und die dafür verwendeten Konstrukte werden überall dort Anwendung finden können, wo es um eine wesentliche Steigerung der Genproduktmenge des Transgens geht, z.B. für Vorhaben eines "protein farmings" oder für die Verschiebung der Zusammensetzung eines Gesamtproteins einer Genfamilie zugunsten des Transgenproduktes, wie es bei der gentechnischen Verbesserung der Aminosäurezusammensetzung von Samenspeicherproteinen in Pflanzen der Fall ist.

#### Die patentgemäße Lösung der Aufgabe

In dem patentgemäßen Verfahren wird eine Lösung erreicht, mit der es gelingt, das Expressionsniveau eines transferierten Gens im Rezipientenorganismus zu steuern, vorzugsweise zu steigern. Diese Steigerung des Expressionsniveaus ist bedeutend höher als in sonstigen bisher bekannten Verfahren erreicht wird. Das patentgemäße Verfahren beruht auf der Nutzung des Replikationsmechanismus von RNA-Viren zur Vermehrung gewünschter Messenger-RNA auf posttranskriptioneller Ebene. Hierfür werden die gewünschten Sequenzen von den zu transferierenden Genen in die jeweils geeigneten patentgemäßen Vektorkonstrukte insertiert und in dieser Form in den Rezipientenorganismus auf geeignete Weise übertragen (z.B. durch Agrobacterium-vermittelten oder biolistischen Gentransfer). Das Verfahren kann dabei in Abhängigkeit von

der Zielstellung so gestaltet werden, daß der Gentransfer eine stabile Integration im Kern- oder Organellengenom oder eine transiente Expression mit jeweils geeigneter Transkriptionssteuerung (auf der Basis von konstitutiven oder regulierbaren Promotoren) anstrebt. Die erfindungsgemäßen Vektorkonstrukte basieren auf dem Genom von RNA-Viren, vorzugsweise Pflanzenviren und beinhalten insbesondere zumindest einen Teil des viralen Replikasekomplexes. Die Integration der Fremdsequenz wird erfindungsgemäß so gestaltet, daß das nach Transfer in vivo gebildete Primärtranskript Erkennungssequenzen aufweist, die es ermöglichen, daß das Primärtranskript durch die Virusreplikase erkannt und behandelt wird wie die Virus-RNA oder ein Teil von ihr selbst. Fremdsequenz und Virussequenz können vorzugsweise müssen jedoch nicht zwingend auf ein und demselben Konstrukt untergebracht werden. Demzufolge kann auch der Transfer und schließlich auch die Transkription beider Teile des patentgemäßen Konstruktes getrennt erfolgen.

Im einzelnen werden die Virusgenome bzw. -Teile von ihnen über reverse Genetik in Konstrukte eingebaut, die einen geeigneten Promotor und - falls notwendig - das Polyadenylierungssignal bereitstellen. Bei den Promotoren handelt es sich entweder um konstitutive, z.B. den 35S- Promotor des cauliflower mosaic virus, oder gewebe- bzw. ontogenese-spezifische Promotoren, z.B. samenspezifische Promotoren. Die Verknüpfung von Promotor und DNA-Kopie des Virusgenoms wird so gestaltet, daß der Transkriptionsstart weitestgehend mit dem Beginn des Virusgenoms übereinstimmt, d.h. daß das spätere Transkript weitestgehend dem 5'-Terminus der Virus-RNA, möglichst ohne Extranukleotide, die die angestrebte Erkennung der RNA durch die Virusreplikase negativ beeinflussen könnten, entspricht. Das Virusgenom wird vorzugsweise jeweils so modifiziert, daß alle für den Replikationsvorgang innerhalb einer primär infizierten Zelle nicht notwendigen Virusgene durch Deletion oder Leseraster-modifizierende Mutagenese inaktiviert wurden. Hierzu zählen zum



- 5 -

Beispiel diejenigen Virusgene, die für das Hüllprotein, den Transport von Zelle zu Zelle und/oder die Vektorübertragung kodieren. Auf diese Weise wird erreicht, daß die späteren chimären Konstrukte sich nicht über die Zellen, die transfiziert wurden, ausbreiten können. Für die Demonstration der patentgemäßen Lösung wurden Konstrukte auf der Basis des Genoms des beet western yellows virus (BWYV) erstellt und mit verschiedenen Modellgenen verknüpft, wobei die Bildung der Primärtranskripte sowohl durch den 35S-Promotor (konstitutiv) als auch einen samenspezifischen Promotor gesteuert wurde. Die Fremdgensequenzen wurden in diesen Fällen vorzugsweise anstelle des Hüllproteingens insertiert, so daß deren Expression unter Steuerung des subgenomischen Promotors des BWYV erfolgte.

Das patentgemäße Verfahren kann vorzugsweise zur Expressionsoptimierung von Fremdgenen, die zwecks "Verbesserung" bestimmter Eigenschaften des Rezipientenorganismus (z.B. die Aminosäurezusammensetzung der Samenspeicherproteine oder Widerstandsfähigkeit gegen verschiedene biotische oder abiotische Schadfaktoren) oder zur Gewinnung artfremder Genprodukte auf dem Weg eines sogenannten Genfarmings transferiert wurden, genutzt werden.

#### Stand der Technik

Es gibt eine Reihe von Zielen bei der gentechnischen Manipulation von Kulturpflanzen zur optimalen Ausprägung bestimmter Eigenschaften bzw. beim "protein farming" die ein hohes Expressionsniveau transferierter Gene erforderlich machen. In der Mehrheit der Fälle wurde versucht, durch Wahl eines starken Promotors, durch Optimierung des Promotors oder durch Verknüpfung von transkriptionssteigernden Sequenzen (enhancer) mit dem Promotor das Expressionsniveau auf Transkriptionsebene zu erhöhen. Das chimäre Gen wurde dann durch Transformation in das Genom der Zielpflanze integriert. Durch

Einfügen mehrerer Genkopien (Tandemkonstrukte oder Mehrfachinsertionen im Genom) konnte die Expression des gewünschten Produkts nicht in allen Fällen weiter gesteigert werden.

Eine Möglichkeit zur Genexpression ganz anderer Art stellt die Nutzung von Pflanzenviren als episomale Vektoren dar. Nach Integration des Fremdgens im Virusgenom wird es bei der Replikation wie ein Virusgen exprimiert. Ein wesentlicher Vorteil eines solchen Systems ist, daß das Fremdgen zusammen mit dem Virusgenom durch Replikation amplifiziert wird, wodurch die Voraussetzungen für eine Hochexpression geschaffen werden (Joshi und Joshi, 1991).

#### 1. DNA-Viren

Zu den ersten Pflanzenviren, die als episomale Vektoren attraktiv erschienen, gehörten DNA-Viren. Beim cauliflower mosaic virus (CaMV), das ein einteiliges Genom aus doppelsträngiger DNA besitzt, ist versucht worden, an verschiedenen Stellen im Genom zusätzliche Sequenzen einzufügen oder vorhandene auszutauschen. Kleine Insertionen wurden zwar an mehreren Stellen toleriert (Hull, 1985), bei längeren einzufügenden Sequenzabschnitten gab es strenge Limitierungen. Einerseits werden zu große DNA-Moleküle nicht mehr in Partikeln verpackt und andererseits wirkt sich der Austausch von Virusgenen gegen Fremdgene drastisch auf die Replikation oder den Virustransport aus. Lediglich die offenen Leserahmen II und VII lassen sich deletieren, ohne die Infektiosität dieser Konstrukte zu beeinflussen (Howarth et al., 1981; Dixon und Hohn, 1984). Bestimmte Mutationen im offenen Leserahmen (ORF) VII sind lethal oder revertieren in vivo (Dixon et al., 1986). Deshalb sind nur Vektoren konstruiert worden, bei denen der ORF II gegen das Fremdgen ausgetauscht wurde. Relativ kleine Gene, wie das der Dihydrofolatreduktase (Brisson et al., 1984), des Interferons (Gronenborn, 1987)

- 7 -

und des Metallothioneins II (Levebvre et al., 1987) wurden mit Hilfe dieser Vektoren erfolgreich exprimiert. Das Expressionsniveau war sehr hoch.

Eine weitere Gruppe von DNA-Pflanzenviren, die als episomale Expressionsvektoren genutzt wurden, sind die Geminiviren. Ihr Genom besteht aus einem oder zwei Molekülen einzelsträngiger DNA. Sie sind als Expressionsvektoren vor allem auch deshalb interessant, weil einige Geminiviren Wirtspflanzen unter den Monocotyledonen haben.

Eines der am besten untersuchten Geminiviren ist das tomato golden mosaic virus (TGMV). Für die Replikation und die systemische Ausbreitung dieses Virus ist das Hüllprotein nicht notwendig und kann deshalb deletiert werden (Etessami et al., 1988; Gardiner et al., 1988; Hayes et al., 1988). Anstelle des offenen Leserahmens für das Hüllprotein wurden kodierende Regionen für das CAT-, GUS- oder das NPT II-Gen eingefügt (Hanley-Bowdoin et al., 1988; Hayes et al., 1988; Hayes et al., 1989; Kanievski et al. 1992). Die Infektion mit solchen Konstrukten erfolgte über Agroinokulation (Grimsley et al., 1986). Dabei wurden Kopien der Konstrukte als Dimere in die T-DNA eines Ti-Plasmids kloniert. Nach Inokulation von Wirtspflanzen mit den rekombinanten Agrobakterien entstehen monomere Virusgenome, die sich dann in primär infizierten Zellen replizieren und schließlich systemisch in der Pflanze ausbreiten (Hayes et al., 1988). Durch die Replikation der veränderten Virusgenome bedingt, wurden hohe Aktivitäten der Markerenzyme gemessen, die einem vielfachen der Aktivität in nicht replizierenden Kontrollen entsprachen (Hayes et al., 1988; Sunter und Bisaro, 1991; Kanievski et al., 1992). Während die Größe des Inserts beim TGMV nicht entscheidend die Replikation beeinflusste, ist bei dem Geminivirus cassava latent virus (CLV) die Insertgröße limitiert (Ward et al., 1988; Etessami et al., 1989). Wie beim TGMV wurden für rekombinante CLV-Genome ein hohes Expressionsniveau des insertierten Fremdgens und systemische

Ausbreitung in Pflanzen beobachtet (Ward et al., 1988).

Bei anderen Viren der Geminivirus-Gruppe (wheat dwarf virus (WSV), maize streak virus (MSV)) wurden ebenfalls die jeweiligen Hüllproteingene gegen unterschiedlich lange Fremdgene ausgetauscht und die Konstrukte in Pflanzenzellen übertragen. Fremdgene ließen sich über das MSV und WDV nur in agroinokulierten Blättern bzw. Protoplasten amplifizieren und exprimieren (Lazarowitz et al., 1989; Matzeit et al., 1991). Bei diesen Viren ist das Hüllprotein für den Virus-transport erforderlich. Eine systemische Ausbreitung der Mutanten ohne Hüllproteingen ist deshalb nicht möglich. Der Austausch des Hüllproteingens gegen das CAT-Gen wirkte sich zwar beim MSV nicht auf die Replikation aus, doch durch die fehlende Ausbreitung war die festgestellte CAT-Aktivität gering (Lazarowitz et al., 1989). Bei Inokulation von Zellkulturen von *Triticum monococcum* mit WSV-Genaustausch-Mutanten konnten Replikationsraten wie bei Wildtyp-WSV erzielt werden (Matzeit et al., 1991). Selbst bei Austausch des Hüllproteingens gegen wesentlich größere Nukleinsäurefragmente, wie das  $\beta$ -Galaktosidasegen aus *E. coli* (Matzeit et al., 1991) oder ein Ac/Ds-Transposon (Laufs et al., 1990), replizierten die Viruskonstrukte dem Wildtyp entsprechend. Daraus wurde gefolgert, daß die Replikation nicht von der Insertgröße abhängt. Eine Verpackung der DNA in Partikel und Virustransport spielen in Zellkulturen keine Rolle. Die Aktivität der Markerenzyme, die von replizierenden WSV-Vektoren exprimiert wurden, war 20-fach höher als bei nicht replizierenden Kontroll-Vektoren. Sie war vergleichbar mit den Werten, die in Zellen von *T. monococcum* durch ein 35S-Promotor getriebenes NPT II -Gen transient erreicht wurden (Matzeit et al., 1991).

Die Ergebnisse zur extrachromosomalen Amplifikation und Expression von Fremdgenen mit Hilfe von DNA-Virusgenomen zeigen, daß der Austausch von viralen Genen gegen fremde Sequenzen prinzipiell möglich ist. Die Fremdsequenzen werden

zusammen mit dem Virusgenom in Pflanzenzellen vermehrt und genau wie das entsprechende Virusgen exprimiert. Das Expressionsniveau der eingefügten Fremdgene wird als hoch eingeschätzt. Genaue Vergleiche mit pflanzlichen Promotoren sind bis auf Ausnahmen (z.B. Matzeit et al., 1991) nicht angestellt worden. Die Nutzung solcher Verfahren hat jedoch Nachteile, die zum einen spezifisch für das benutzte Virus sind und zum anderen generell bei DNA-Viren zum Ausdruck kommen.

Der Wirtskreis des CaMV beispielsweise ist sehr klein und Pflanzen außerhalb des Wirtskreises können mit chimären Konstrukten nicht infiziert werden. Bei allen Viren der Caulimovirus-Gruppe ist weiterhin die Insertionsgröße streng limitiert (maximal ~ 1 kb). Selbst innerhalb dieser Grenze kommt es relativ häufig zu Deletionen von Fremdsequenzen, was auf den retroviralen Replikationsmechanismus dieser Viren zurückzuführen ist (Grimsley et al., 1986). Virusgenome mit integriertem Fremdgen bleiben infektiös und induzieren in der Wirtspflanze Symptome. Der Austausch des ORF II des CaMV gegen ein Fremdgen verhindert lediglich die Übertragung durch Blattläuse. Klonierte DNA ist aber auch mechanisch übertragbar (Fütterer et al., 1990).

Bei den Geminiviren mit zweiteiligem Genom (TGMV, CLV) ist ein Genomteil notwendig für die systemische Ausbreitung in Pflanzen. Wird das Hüllproteing, das sich auf dem anderen Genomteil befindet gegen ein Fremdgen ausgetauscht, muß die zweite Komponente mit in die Pflanze gebracht werden, um ein hohes Expressionsniveau durch systemische Ausbreitung zu erzielen. Ein Weg solche Doppelinfektionen zu umgehen, ist die stabile Integration der fremdgentragenden Komponente als Tandemkopie im Genom der Pflanze (Hayes et al., 1988a; Kanievski et al., 1992).

Der Austausch des Hüllproteingens bei Geminiviren mit einteiligem Genom (MSV, WDV) ist in jedem Fall mit einem

Verlust der Fähigkeit zur systemischen Ausbreitung verbunden. Eine Anwendung ist daher auf Pflanzenzellkulturen beschränkt (Matzeit et al., 1991). Die Größe der Insertion ist bei den Geminiviren zwar weniger limitiert als bei den Caulimoviren, über die Stabilität großer Insertionen gibt es jedoch widersprüchliche Ergebnisse (Stanley und Townsend, 1986; Ward et al., 1988). Um den Effekt eventuell auftretender Instabilität zu mindern, wäre die stabile Integration von Tandemkopien im pflanzlichen Genom ein Ausweg (Davies und Stanley, 1989).

Bei allen DNA-Viren ist es praktisch unmöglich eine gewebe- bzw. entwicklungsspezifische Expression der gewünschten Fremdgene zu erreichen. Die Expression findet hauptsächlich in grünen Pflanzenteilen statt. Gerade beim protein farming ist jedoch eine spezifische Expression im Samen, der sich durch höheren Proteinanteil an der Gesamtmasse auszeichnet und durch geringen Wassergehalt lagerfähig ist, anstrebenswert.

## 2. RNA-Viren

Bei den RNA-Viren, zu denen der größte Teil der Pflanzenviren gehört, gibt es bislang nur wenige Beispiele über die Verwendung ihrer Genome zur Expression von Fremdgenen. Erst die Klonierung von vollständigen cDNA-Kopien einiger Virusgenome, von denen sich infektiöse RNA-Transkripte synthetisieren ließen, machten derartige Manipulationen möglich. RNA-Viren replizieren über eine viruskodierte RNA-abhängige RNA-Polymerase (Replikase). Das Enzym ist spezifisch für das entsprechende Virus und sichert eine hohe Vermehrungsrate. Die entstehenden Tochter-RNA-Moleküle mit (+)-Strang-Polarität können bei einigen Viren direkt als messenger-RNA fungieren. Je nach Expressionsstrategie des Virus werden von dieser RNA nur die 5'-gelegenen offenen Leserahmen translatiert oder es entsteht ein Polyprotein, welches später durch limitierte,

ortsspezifische Proteolyse in die Einzelkomponenten zerlegt wird. Bei anderen Viren erfolgt die Expression der 3'-nahen Gene über die Bildung subgenomer RNA vom (-)-Strang-Intermediat der genomischen RNA. Die subgenomische RNA ist als messenger-RNA aktiv. Die Hüllproteingene bei einigen Pflanzenviren werden beispielsweise über subgenomische RNA exprimiert. In Anbetracht des hohen Expressionsniveaus waren es vor allem die subgenomischen Promotoren für die Hüllproteingene, die für die Steuerung der Expression von Fremdgenen genutzt werden sollten.

Die erste Publikation, in der von der erfolgreichen Hochexpression eines Fremdgens über ein RNA-Virus in Pflanzen berichtet wurde, erschien 1986 (French et al., 1986). Als Vektor diente das brome mosaic virus (BMV). Dieses Virus besitzt ein dreigeteiltes RNA-Genom. Zwei Genomteile kodieren für Replikationsfunktionen, die in trans auch die RNA3 vermehren, auf der sich 2 offene Leserahmen befinden (Ahlquist et al., 1981). Von der RNA3 wird eine subgenome RNA gebildet, die das Hüllprotein kodiert. Aus folgenden Gründen erschien das BMV als episomaler Vektor besonders geeignet zu sein (French et al., 1986). Durch das geteilte Genom und die in trans Wirksamkeit der Replikase steht die RNA3 zur gentechnischen Manipulation zur Verfügung, ohne den Replikationsprozeß als solchen negativ zu beeinflussen. Vorausgesetzt, daß die Replikase die veränderte RNA3 erkennt, wird diese einschließlich des eingefügten Fremdgens vermehrt. Das Virus vermehrt sich außerordentlich stark in Wirtspflanzenzellen. In infizierten Pflanzen akkumuliert das Hüllprotein in Milligramm-Mengen pro Gramm Gewebe.

Nach Deletion des größten Teils der kodierenden Region für das Hüllprotein wurden veränderte in vitro Transkripte der RNA3 zusammen mit RNA1 und 2 in Protoplasten (*Hordeum vulgare*) inokuliert. Dem molaren Verhältnis nach wurde ungefähr halb soviel verkürzte subgenome RNA gebildet wie bei Inokulation mit Wildtyp-RNA.

Bei anderen Konstrukten wurde die deletierte Region durch ein CAT-Gen ersetzt. Die chimäre RNA akkumulierte 5-15fach schwächer als Wildtyp- RNA. Die CAT-Enzymaktivität, die in inokulierten Protoplasten gemessen wurde, war jedoch außerordentlich hoch. Im Vergleich zu transgenen Pflanzen mit Expression des CAT-Gens unter Kontrolle von einem Rubisco- oder Nos-Promotor (Herrera-Estrella et al., 1984), war die gemessene Aktivität 7 bzw. 23 mal so hoch.

Jupin et al. (1990) suchten nach cis-aktiven Elementen, die für die Replikation der RNA3 des beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) wichtig sind. Das Virus besteht wie das BMV aus mehreren (4) Genomteilen, von denen nur die RNA1 und 2 für die Replikation in Pflanzen erforderlich sind. Ungefähr 75% des internen Bereichs der RNA3 konnten ohne Verlust der Replizierbarkeit der RNA3 deletiert werden. Anstelle des vorhandenen Leserahmens wurde das GUS-Gen insertiert. Transkripte solcher cDNA-Mutante wurden nach Coinokulation mit RNA1 und 2 in *Chenopodium quinoa* vermehrt. In Blättern solcher Pflanzen wurde hohe GUS-Aktivität nachgewiesen. Die Schaffung eines veränderten Replikons ist demzufolge möglich. RNA3 und RNA4 des BNYVV sind jedoch variable Bestandteile des Virus. In Abhängigkeit von der Art und Weise der Übertragung und vom Vermehrungswirt können diese RNAs Deletionen tragen oder völlig aus den Isolaten verschwinden (Koenig et al., 1986). Aufgrund fehlender Selektion wird es daher kaum möglich sein das Fremdgen über längere Zeit zu stabilisieren.

Die Vorteile von RNA-Viren mit geteiltem RNA-Genom nutzend, wurde auch das barley stripe mosaic virus (BSMV) als episomaler Expressionsvektor für Fremdgene verwendet (Joshi et al., 1990). Das Hüllprotein-Gen der RNA $\beta$  wurde gegen das Luziferase-Gen ausgetauscht und Transkripte zusammen mit Transkripten der RNA $\alpha$  und  $\gamma$  in Protoplasten transfiziert. Im Vergleich zu transfizierter Luziferase-mRNA wurde so eine 42fach höhere Enzymaktivität in Tabakprotoplasten gemessen. In Maisprotoplasten betrug die Aktivitätssteigerung durch



Virusamplifikation 60h nach Transfektion sogar das 123fache.

Am Tabakmosaik Virus (TMV) wurden neben der Expression von Fremdgenen auch grundlegende Untersuchungen zur Stabilität chimärischer Virusgenome angestellt. Takamatsu et al. (1987) fanden, daß die Deletion des Hüllproteingens beim TMV keinen bzw. nur geringfügigen Einfluß auf die Replikation solcher Mutante hatte. In Tabakpflanzen, in denen sich der TMV--Wildtyp systemisch ausbreitet und typische Mosaiksymptome erzeugt, replizierte die hüllproteinlose Mutante jedoch nur in inokulierten Blättern und induzierte keine Symptome.

Transkripte, die das CAT-Gen unter Kontrolle des subgenomischen Promotors für das Hüllproteingens enthielten, replizierten in inokulierten Tabakblättern. Es ist jedoch deutlich weniger RNA nachweisbar gewesen (genomische und subgenomische), als in parallelen Versuchen mit der Wildtyp--RNA oder der hüllproteinlosen Mutante. Auf das fehlende Hüllprotein, welches eine Rolle beim Ferntransport in Pflanzen spielt (Atabekov und Dorokhov, 1984), ist zurückzuführen, daß CAT-Aktivität nicht systemisch nachweisbar war. Die in diesen Versuchen gemessene CAT-Aktivität im inokulierten Blattgewebe war geringer, als aus der Hüllproteinexpression zu erwarten war. Dies wird auf die schwache Replikation der Chimären zurückgeführt.

Mit der Nachkommenschaft der CAT-Mutanten wurden erneut Tabakpflanzen inokuliert. Auch in diesem Fall wurde CAT--Aktivität in inokulierten Blättern gefunden. Obwohl die Homogenität der RNA-Nachkommenschaft auf Sequenzebene nicht bestimmt worden ist, folgerte man aus den Aktivitätswerten, daß die Mutationsrate während der RNA-Replikation nicht so hoch ist wie vermutet wurde (Van Vloten-Doting et al., 1985).

Neben dem Austausch des Hüllproteingens gegen ein Fremdgen versuchten Takamatsu et al. (1990) Fusionsproteine aus Hüllprotein und Enkephalin, einem Hirnpeptid, über einen

TMV-Vektor in Pflanzen zu produzieren. Die Veränderungen in der TMV-RNA beschränkten sich auf eine kurze (18 Basen) 3'-Extension des Hüllprotein-ORF. Dennoch breiteten sich die Hybridviren in systemischen TMV-Wirten nicht systemisch aus, sondern riefen auf inokulierten Blättern Lokalläsionen hervor. Analyse der Proteinsynthese in Protoplasten, die mit Hybrid-Viren inokuliert wurden, ergab, daß die Syntheserate für das Fusionsprotein zunächst wie beim unveränderten Hüllprotein war, später (22-24h p.i.) jedoch drastisch abnahm.

Dawson et al. (1989) konstruierten ein Hybrid-Virus, bei dem in ein vollständiges TMV-Genom ein CAT-Gen unter Kontrolle eines Duplikats des subgenomischen Hüllproteingen-Promoters eingefügt wurde. Das zusätzliche Gen befand sich entweder vor oder hinter dem Hüllproteingen. Auf diese Weise wurde erreicht, daß die chimärische RNA in Viruspartikel verpackt wurde.

Das Hybridvirus mit der CAT-Gen-Insertion vor dem Hüllprotein-ORF replizierte in Tabak wie Wildtyp-TMV. Es breitete sich systemisch aus und erzeugte schwache Mosaiksymptome in jungen Blättern. Hohe CAT-Aktivität war in inokulierten Blättern vorhanden. In systemisch infizierten Blättern konnte jedoch nur geringe bzw. keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Geringe Aktivität korrelierte mit einer Abnahme der Konzentration subgenomischer RNA in Northern-Blots. Nach längerer Infektion kam es zur Rekonstitution der Wildtyp-RNA. Letzteres wird auf homologe Rekombination an duplizierten Sequenzabschnitten zurückgeführt (subgenomischer Promotor).

Insertion des CAT-Gens unmittelbar vor dem 3'-Ende der Virus-RNA wirkte sich drastisch auf die Replikation dieses Hybrid-Virus in Pflanzen aus. Daraus resultierten schwache Symptomausprägung und geringe Expression des CAT-Gens.

In weiterführenden Arbeiten (Donson et al., 1991) wurde das

- 15 -

zu insertierende Fremdgen (NPTII, DHFR) mit einem heterologen subgenomischen Promotor aus dem odontoglossum ringspot virus (ein Tobamo-Virus mit nur 45% Sequenzhomologie zum U1-Stamm des TMV) gekoppelt. Auf diese Weise sollte die Häufigkeit der homologen Rekombination auf ein Minimum beschränkt werden. Die Chimären breiteten sich systemisch in Tabakpflanzen aus. Die Replikation und schließlich die Ausbeute an Viruspartikeln entsprachen der beim TMV-Wildtyp. Auch nach mehreren Passagen in *Nicotiana benthamiana* blieb die insertierte Sequenz des DHFR-Gens erhalten. Klonale Populationen konnten sogar über 10 Passagen in einem Lokalläsionswirt ohne merkliche Veränderung der Sequenz vermehrt werden. Das größere NPTII-Insert war nicht so stabil. Nach 1-3 Passagen in einem systemischen Wirt wurden Teile des Inserts deletiert. In Western-Blots konnte nachgewiesen werden, daß weniger NPTII-Protein extrahierbar war als Hüllprotein.

Ähnliche Versuche wie am TMV wurden am potato virus X (PVX) vorgenommen (Chapman et al., 1992). Ein Fremdgen (GUS) ist zum einen gegen das Hüllprotein ausgetauscht und zum anderen zusätzlich in das Genom des PVX eingefügt worden. Austauschmutanten replizierten nach Elektroporation in Protoplasten schwächer als der Wildtyp. Die Northern-Analyse zeigte, daß auch weniger subgenomische RNA gebildet wurde. Inokulierte ganze Pflanzen blieben symptomlos und RNA-Nachkommenschaft konnte in solche Pflanzen nicht nachgewiesen werden. Konstrukte mit zusätzlichem GUS-Gen unter Kontrolle eines Duplikats des subgenomischen Promotors für das Hüllprotein replizierten in Protoplasten wie Genaustauschmutanten. Bei Inokulation ganzer Pflanzen kommt es jedoch zur Symptomausbildung und systemischer Ausbreitung. Hohe GUS-Aktivität wurde in inokulierten und nicht inokulierten Blättern gemessen. Wie bei adäquaten TMV-Mutanten (Dawson et al., 1989) zeigte die Northern-Analyse der sich systemisch ausbreitenden Chimären-Population, daß das GUS-Gen teilweise oder vollständig deletiert wurde. Die am häufigsten auf-

- 16 -

tretende RNA-Population comigrierte mit Wildtyp-RNA, d.h. die Insertion wurde durch homologe Rekombination der duplizierten Sequenzen eliminiert.

Dolja et al. (1992) fügten das GUS-Gen als zusätzliche Sequenz in das tobacco etch virus (TEV) ein. Die Expressionsstrategie dieses Virus (Potyvirus) unterscheidet sich von allen bisher genutzten dadurch, daß von der genomischen RNA ein Polyprotein translatiert wird, welches durch spezifische, kodierte Proteinase-Funktionen in funktionelle Proteine prozessiert wird. Die Art und Weise der GUS-Insertion führte zu einem Fusionsprotein, welches N-terminal das GUS-Peptid und C-terminal eine viruskodierte Proteinase enthielt. Beide Proteine blieben trotz der Fusion biologisch aktiv. Das chimärische Virus breitete sich systemisch in Tabakpflanzen aus, erzeugte jedoch schwächere Symptome als das Wildtyp-Isolat. Hohe Enzymaktivität konnte in inokulierten und nichtinokulierten Blättern nachgewiesen werden. Die GUS-Sequenz blieb über mehrere Passagen (4-7) stabil. Häufige Passagen führten letztlich jedoch zu teilweiser Deletion des GUS-Gens.

### 3. Vorteile und Probleme

Transiente Expressionssysteme auf der Basis von Virusgenomen, d.h. ohne Integration des gewünschten Fremdgens im pflanzlichen Genom, haben Vorteile gegenüber den üblichen stabilen Expressionsverfahren. Da es möglich ist, mit hoher Effizienz Protoplasten, Zellkulturen oder intakte Pflanzen mit Virus--RNA-Transkripten bzw. Derivaten zu transfizieren, besteht ein Vorteil darin, daß teils langwierige teils schwierige Regenerationsverfahren umgangen werden können. Einige RNA--Viren (z.B. das TMV) haben zudem ein außerordentlich breites Wirtsspektrum, wodurch viele Pflanzenarten für derartige Manipulationen zugänglich sind. Im Falle der uneingeschränkten Ausbreitung der transfizierten Konstrukte können Pflanzen in jedem beliebigen Entwicklungsstadium eingesetzt

und nach Erreichen des maximalen Expressionsniveaus des Fremdproteins geerntet werden.

Der wohl wesentlichste Vorteil solcher Systeme ist die theoretisch erzielbare Expressionshöhe. Nach Transfektion weniger Ausgangsmoleküle repliziert sich die RNA mit Hilfe der eigens kodierten Replikase und von Wirtskomponenten bis zu hoher Kopienzahl pro Zelle. Durch Nutzung von viralen subgenomischen Promotoren für die Initiation der Synthese von Fremdgen-mRNA entsteht eine große Anzahl von Matrizen für die Fremdproteinsynthese. Bei natürlichen Virusinfektionen ist meistens das Hüllprotein das am häufigsten synthetisierte Virusprotein. Es kann in Milligramm-Mengen, aus einem Gramm Frischmasse, isoliert werden. Gelingt es Fremdproteine mit ähnlicher Effizienz von Pflanzenzellen produzieren zu lassen, so liegt das Expressionsniveau um Größenordnungen über dem durch starke pflanzliche Promotoren erreichbaren Niveau. Die Expression ist außerdem unabhängig von sogenannten Positionseffekten. Letzteres ist eine Erscheinung bei stabil im Genom integrierten Fremdgenen, die es erforderlich macht, viele unabhängige Transformanten zu erzeugen und zu testen, um schließlich solche mit hoher Fremdgenexpression auszuwählen.

Den beschriebenen Virussystemen zur Expression von Genen in Pflanzen sind noch eine Reihe von Problemen eigen, die eine Anwendung derzeit noch behindern. Erstens sind replizierende RNA-Virussysteme autonom. Gelangt die RNA in die Pflanzenzelle, kann die Replikation nicht mehr gesteuert werden. Zum einen ist dadurch gewebespezifische Expression ausgeschlossen. Das Fremdprotein entsteht dort, wo sich auch das Virus replizieren kann. Zum anderen wirft dies Sicherheitsbedenken auf. Denn zusammen mit leichter Übertragbarkeit der RNA (mechanisch) auf andere Pflanzen könnten solche Konstrukte außer Kontrolle geraten. Zweitens ist man, wie die Beispiele zeigen, auf intakte Virusgenome angewiesen, um eine maximale Expression in ganzen Pflanzen zu erreichen.

Fehlen oder Behinderung einer Funktion ist mit absinkender Replikationsrate per se oder geringerer Expression durch inhibierte Ausbreitung verbunden. Deshalb ist es schwierig, einen geeigneten Insertionsort für Fremdsequenzen zu finden. Drittens wird darauf hingewiesen, daß RNA- Replikasen keine proof reading-Mechanismen besitzen, was nach wenigen Replikationszyklen zu Fehlern insbesondere im Insert führt, weil hier die Selektion fehlt. Viertens können durch Rekombination insbesondere an duplizierten viralen Sequenzen in relativ kurzer Zeit große Teile bzw. die gesamte insertierte Sequenz deletiert werden. Die Deletion des Inserts führt schnell zur Einstellung der Fremdproteinsynthese, weil die entstehenden RNA-Spezies besser replizieren und mit insert-tragenden Formen effektiv konkurrieren.

Für einige dieser Probleme gibt es bereits Lösungen, die, wenn auch nicht in jedem Fall praktisch umgesetzt, in Übersichten von Ahlquist und Pacha (1990), Leiser (1990) und Joshi und Joshi (1991) theoretisch begründet werden.

Um Insertionsorte für Fremdgene zu schaffen, können virus-kodierte Funktionen als chimärische Gene im Genom von Zielpflanzen stabil integriert und exprimiert werden. Aus Untersuchungen des Virustransports ist bekannt, daß in transgenen Pflanzen exprimierte Gene für Transportproteine Defekte im Virusgenom komplementieren (Deom et al., 1987; van Dun et al., 1988). Genaustausch-Mutanten von RNA-Viren, bei welchen ein Fremdgen gegen ein Transportprotein ausgetauscht wurde, könnten auf dieselbe Weise komplementiert werden (Joshi und Joshi, 1991). So lassen sich "containment"-Bedingungen schaffen, da sich das fremdgentragende Viruskonstrukt nur in entsprechenden transgenen Pflanzen ausbreiten kann. Dieselbe Strategie wurde für Replikase-Gene (van Dun et al., 1988) und für Hüllprotein-Gene verfolgt.

Noch einen Schritt weiter gehen Überlegungen von Ahlquist und Pacha (1990) und Leiser (1990). Der Grundgedanke besteht

darin, einerseits virale Geninformation für die Bildung der Replikase stabil in Pflanzen zu exprimieren und andererseits die mRNA, die für das interessierende Genprodukt kodiert, mit Erkennungssequenzen für die Virusreplikase auszustatten, so daß es zu der gewünschten mRNA-Amplifikation kommt. Prädestiniert für diesen Zweck scheinen RNA-Viren mit geteiltem Genom zu sein (BMV, BNYVV u.a.). Erstens wirken die Replikasen dieser Viren natürlicherweise in trans, d.h. sie amplifizieren nicht nur die RNA-Genome auf denen sie selbst kodiert sind sondern auch andere. Zweitens sind die regulatorischen Sequenzen für die Amplifikation größtenteils auf die unmittelbaren 5'- und 3'-Enden der zu amplifizierenden RNA beschränkt. Ein Fremdgen kann zwischen solche Bereiche eingefügt werden, wie für das BNYVV gezeigt wurde (Jupin et al., 1990). Bei der stabilen Integration solcher Konstrukte im Genom tauchen jedoch Schwierigkeiten auf, die damit zusammenhängen, daß primäre Transkripte mit exakten Enden auszustatten sind. Anderenfalls werden diese RNA's nicht von der Virusreplikase als Template akzeptiert (Leiser, 1990).

#### Beispiele

Aus cDNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge, die in der Summe teilweise überlappend die gesamte BWYV-Sequenz enthalten, wurde ein Klon voller Länge des Virus konstruiert (siehe Veidt et al., 1992). Der Klon ermöglichte die Synthese von (+)RNA unter Kontrolle des Bacteriophagen T7-RNA-Polymerase Promotors. Die in vitro Transkripte replizierten sich wie Virus-RNA nach Elektroporation in Protoplasten von *Chenopodium quinoa*. Die Synthese des Hüllproteins wurden nachgewiesen.

Nach dem Überprüfen der biologischen Aktivität der in vitro Transkripte, wurde die cDNA am 5'-Ende mit dem 35S-Promotor

des CaMV und am 3'-Ende mit dem nos-Polyadenylierungssignal verbunden. Zwischen dem 3'-Ende der Virussequenz und dem Polyadenylierungssignal wurde eine Ribozymsequenz eingefügt, die nach der Transkription autokatalytisch das exakte 3'-Ende der Virus-RNA kreiert (methodische Details siehe Leiser et al., 1992). Auf diese Weise entstand eine Expressionskassette, die es erlaubte, über Elektroporation oder Agrobacterium-inokulation in Pflanzen bzw. Pflanzenzellen BWYV-RNA zu produzieren. Solche in vivo Transkripte replizierten genau wie Virus-RNA.

Nach Bestätigung der Identität und biologischen Aktivität (Leiser et al., 1992) bildete das Konstrukt GRN in Abb.1 den Ausgangspunkt für alle weiteren Modifikationen und Klonierungsschritte.

#### Beispiel 1

Das Beispiel erläutert auf welche Weise für die Replikation abkömmliche Virusgene durch in vitro Mutagenese abgeschaltet werden können. Gleichzeitig sind dabei Insertionsorte zu schaffen, in die anschließend Fremdsequenzen eingebunden werden. Die Replikation solcher Konstrukte und die Synthemenge der gewünschten Fremdgenprodukte lassen sich nach Transfer in Protoplasten und transienter Expression überprüfen. Es ist festzustellen, daß im Vergleich zu herkömmlichen Expressionskassetten, bei denen die Transkription der Gene ausschließlich durch einen CaMV-35S-Promotor gesteuert wird, mit den beschriebenen Konstrukten in Abhängigkeit vom Versuch zwischen 3- und 10-fach mehr Protein synthetisiert wird. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei der Transkription replikationsaktive RNA gebildet wird. Von der RNA werden zunächst die Leseraster für die viruskodierte Teile der Replikase translatiert. Nach Ausbildung des Replikasekomplexes, an dem auch pflanzliche Faktoren beteiligt sind, wird die RNA repliziert. Dabei entstehen sowohl



RNA-Moleküle voller Länge als auch subgenomische RNA. Von der subgenomischen RNA kann der eingefügte Leserahmen für das Fremdgen translatiert werden. Der Translation ist also eine RNA- Vermehrung vorangestellt, die durch den viralen Replikationsmechanismus des BWYV erfolgt. Es entsteht eine größere Menge mRNA, die für die Fremdproteine kodiert.

Um die Translation einzelner Leserahmen durch in vitro Mutagenese auszuschalten, wird ein Eco RV-Fragment und ein Bam HI-Fragment entsprechend in den Phagemiden pBluescript(+) bzw. pBS(+) subkloniert. Der Plasmid-Klon GRN wird dazu mit der Restriktionsendonuklease EcoRV oder BamHI verdaut und die entstehenden Spaltprodukte mit einer Größe von 1500 bp bzw. 1104 bp isoliert. Die Vektoren pBluescript(+) und pBS(+) werden ebenfalls entsprechend mit EcoRV bzw. BamHI gespalten und anschließend dephosphoryliert. Nach der Isolierung der linearisierten Vektoren werden pBluescript(+) mit dem EcoRV-Fragment und pBS(+) mit dem BamHI-Fragment aus dem Klon GRN ligiert. Es entstehen entsprechend die Subklone SK Eco RV und SK Bam HI. Als Wirtstamm für alle Klonierungen dient der Bakterienstamm TG 1 (Amersham). Nach Bestimmung der Orientierung der subklonierten Fragmente durch Restriktionsanalyse wird über Infektion der phagemidtragenden Bakterien mit dem Helferphagen K07 die Synthese einzelsträngiger DNA induziert. Die einzelsträngige DNA enthält die "sense"-Stränge der subklonierten DNA-Fragmente. Nach Reinigung der einzelsträngigen DNA werden in vitro Mutagenesen mit spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Grundlagen bilden ein Kit der Firma Amersham (Oligonucleotide-directed in vitro mutagenesis system) und die enthaltenen Vorschriften.

Die Sequenz des Eco RV-Fragments im Bereich des Startkodons des ORF I des BWYV wird durch die Mutagenese so geändert, daß anstelle des AUG-Kodons der Restriktionsort Sna BI entsteht (siehe Abb.2 (A)). Die Zerstörung des Startkodons und seiner Umgebung soll bewirken, daß dieser Leserahmen nicht mehr in das entsprechende Virusprotein unbekannter

Funktion translatiert werden kann. Die Sequenz des BamHI-Fragments im Bereich des Startkodons des ORF IV des BWYV soll in den Restriktionsort Xho I umgewandelt werden. Dieser Restriktionsort wird später als Insertionsort für Fremdsequenzen dienen. Für Insertionen in diesen Xho I-Ort ist es erforderlich, daß sich kein weiterer Xho I-Ort in der Sequenz des Klons SK Bam HI befindet. Der originale Xho I-Ort (pos. 6351 in Abb.1) auf dem subklonierten Bam HI-Fragment muß deshalb inaktiviert werden. Dies geschieht durch Verdauung des Klons SK Bam HI mit dem Enzym Xho I und Auffüllen der überhängenden Enden mit T4-DNA-Polymerase. Anschließend werden die entstandenen stumpfen Enden des Plasmids religiert. Jetzt wird die in vitro Mutagenese durchgeführt und dabei ein neuer Xho I-Ort im Bereich des Startkodons für das Hüllproteing geschaffen. Das verwendete Oligonukleotid und die dazugehörige Originalsequenz des Virus sind in Abb.2 (B) aufgeführt.

Nach der Restauration des Xho I-Ortes wird das gesamte Insert im pBS(+) einkloniert. Das mutierte Eco RV-Fragment aus dem Klon SK Eco RV wird mit der Restriktionsendonuklease Eco RV herausgeschnitten und isoliert. Das Fragment wird anschließend gegen das originale EcoRV-Fragment im Ausgangsklon GRN ausgetauscht. Der entstandene, als Muta ORF I bezeichnete Klon entspricht bis auf das mutierte Startkodon für den Leserahmen I dem Klon GRN. Obwohl der Leserahmen I nicht mehr translatiert werden kann, ist die in vivo in pflanzlichen Protoplasten transkribierte RNA von Muta ORF I in der Lage zu replizieren.

In den Klon SK Bam HI kann nach der Mutagenese jeder beliebige Nukleinsäureabschnitt zwischen dem neuentstandenen Xho I-Ort und den verbliebenen Restriktionsorten des Polylinkers von pBS(+) stromabwärts vom Bam HI-Insert eingefügt werden. Die Virussequenz wird dabei gegen den zu insertierenden Abschnitt ausgetauscht. Wichtig ist, daß nach der Insertion am 3'-Ende des eingefügten Fragments ein Bam HI- und

ein Eco RI-Ort vorhanden sind. Der Eco RI-Ort wird benötigt, um den zuvor durch Auffüll-Reaktion und Religation zerstörten Xho I-Ort im subklonierten Bam HI-Fragment zu restaurieren. Dies erfolgt durch Austausch des Eco RI-Fragments zwischen dem Eco RI-Ort (pos. 6419 in Abb.1) auf dem Bam HI-Fragment und dem erforderlichen Eco RI-Ort 3'-seitig vom insertierten Nukleinsäureabschnitt gegen das Eco RI-Fragment im Klon SK Bam HI.

Nach der Restauration des Xho I-Ortes wird das gesamte Insert im pBS(+) mit Bam HI herausgeschnitten (ein Bam HI-Ort stromab des Fremdgens ist dafür unbedingte Voraussetzung). Das Insert besteht aus der Virus-cDNA-Sequenz von Position 2902 bis 3479 (siehe Veidt u.a., 1988) und dem Leserahmen des insertierten Gens. Virussequenz und Fremdgen sind über den durch Mutagenese geschaffenen XhoI-Ort miteinander verbunden. Das Bam HI-Fragment wird isoliert und gegen das Bam HI-Fragment aus dem Klon Muta ORF I ausgetauscht.

Das entstehende rekombinante Plasmid enthält anstelle des Leserahmens für das Hüllprotein von Pos. 3480 bis 4005 (siehe Veidt u.a., 1988) einen fremden Nukleinsäureabschnitt, der nach RNA-Replikation wie der Hüllprotein-Leserahmen exprimiert wird.

Als fremde Nukleinsäureabschnitte werden beispielsweise die Leserahmen der  $\beta$ -Glucuronidase und des methioninreichen 2S-Samenproteins aus *Bertholetia excelsa* auf die oben geschilderte Weise in das Konstrukt Muta ORF I eingefügt. Wichtig ist, daß die Leserahmen eigene Start- und Stopkodone enthalten, die die richtige Translation in funktionale Proteine ermöglichen. Der Promotor und das Polyadenylierungssignal der Gene werden nicht benötigt und deshalb deletiert.

Die entstehenden Konstrukte wurden GRN-GUS und GRN-BNG bezeichnet. Die Plasmide werden gereinigt und als DNA in pflanzliche Protoplasten transfiziert. Die Transfektion

erfolgt durch Elektroporation. In  $2 \times 10^5$  Protoplasten werden 15mg Plasmid-DNA transfiziert. Die Methode zur Elektroporation von Veidt u.a. (1992) wird verwendet. Die Protoplasten werden nach der Transfektion in einem Minimalmedium nach Rottier u.a. (1979) drei Tage inkubiert. Nach der Ernte der Protoplasten erfolgt die Expressionsanalyse auf RNA- und Protein-Ebene.

## Beispiel 2

Ziel dieses Beispiels ist die Erstellung von Konstrukten, die eine stabile Integration im Pflanzengenom und konstitutive Expression einer mutierten BWYV-cDNA mit integriertem Fremdgen erlauben.

Die Plasmide GRN-GUS und GRN-BNG aus dem Beispiel 1 enthalten einzelne Restriktionsorte für die Enzyme Kpn I und Sal I. Durch Restriktionverdau mit beiden Enzymen wird bei jedem der Plasmide ein Fragment freigesetzt, welches aus einem 35S-Promotor des CaMV, der mutierten cDNA des BWYV mit integriertem Fremdgen und einem nos-Polyadenylierungssignal besteht. Diese funktionsfähigen Expressionskassetten werden einzeln in den Binärvektor pBIN19, der kompatible Restriktionsorte besitzt, kloniert. Nach Transformation in einen kompatiblen Stamm von *Agrobacterium tumefaciens* (vorzugsweise durch Elektroporation) kann über übliche Methoden des *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfers die T-DNA aus pBIN 19, welche die erwähnte Expressionskassette enthält, im Genom von Pflanzenzellen integriert werden.

Die verwendeten *Agrobacterien*stämme (beispielsweise *A. tumefaciens* 2260 oder EHA 101 für die Transformation von Tabak und EHA 101 für die Transformation von *Vicia narbonensis*) enthalten ein residentes Plasmid auf dem die Virulenz-Funktionen enthalten sind. Nach Selektion der *Agrobakterien*kolonien, die das Binärvektorkonstrukt ent-

halten, werden mit den Bakteriensuspensionen Pflanzenzellen transformiert. Zur Transformation von Tabak (*N. tabacum* cv. Samsun) wird die Blattscheiben-Methode verwendet (siehe Horsch et al., 1985). Die Transformation von *Vicia narbonensis* erfolgt nach einer Methode von Pickert et al. ( ). Nach der Transformation werden transgene Gewebe, Sprosse und regenerierte Pflanzen mit Kanamycin im Medium selektiert. Ein entsprechendes Resistenzgen befindet sich zwischen den T-DNA-Bordern im Binärvektor pBIN19 und wird bei der Transformation zusammen mit dem chimären Konstrukt im Genom der Pflanzen integriert.

Die modifizierte Virus-RNA wird wie bei transienter Expression in Protoplasten vom 35S-Promotor transkribiert und amplifiziert (siehe Beispiel 1). Die Integration im Genom bewirkt, daß die replikationsaktive RNA in jeder Zelle konstitutiv exprimiert wird, in der der 35S-Promotor aktiv ist. Die Fremdproteine (GUS oder 2S-Samenprotein) werden somit in der gesamten Pflanze gebildet.

### Beispiel 3

Das patentgemäße Verfahren bietet den Vorteil, daß Fremdgene gewebe- bzw. entwicklungsspezifisch hoch exprimiert werden können. In diesem Beispiel wird eine samenspezifische Expression der Vektorkonstrukte in transgenen Pflanzen beschrieben.

Um eine entwicklungs- und gewebespezifische Expression der Fremdgene im Samen zu erreichen, wird die mutierte Virus-cDNA unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors gestellt. Der vollständige Promotor eines Samenspeicherproteins (Phaseolin-Promotor) kloniert in pBluescript KS(+) und das subklonierte und mutierte EcoRV-Fragment (siehe Beispiel 1) bilden den Ausgangspunkt für die exakte Ligation des Transkriptionsstartorts des Promotors mit dem 5'-Terminus der Virus-cDNA. Der Promotor ist so kloniert, daß sich am 3'-Ende

ein Eco RV-Ort befindet. Das Plasmid wird mit dem Enzym Eco RV linearisiert und das EcoRV-Fragment aus dem mutierten Klon Sk EcoRV durch Ligation eingefügt. Ein Klon, bei welchem die Leserichtung des Promotors mit der entsprechenden sense-Richtung des 5'-Endes der Virus-cDNA übereinstimmt, wird für die weitere Bearbeitung ausgewählt. In einem solchen Klon befinden sich zwischen dem Transkriptionsstartort des Phaseolin-Promotors und dem 5'-Ende der Virus-cDNA sowohl Teile der nichttranslierten Region des Phaseolin-Gens, die aus dem Promotor-Klon stammen, als auch 3'-terminale Teile des 35S-Promotors vom einzelnen Eco RV-Ort (pos. 3291 in Abb.1) bis zum Transkriptionsstart, die auf dem subklonierten Eco RV-Fragment vorhanden sind. Diese Sequenzen müssen, um eine exakte Fusion von Transkriptionsstartort des samen-spezifischen Promotors mit dem 5'-Ende der Virus-cDNA zu erhalten deletiert werden. Über eine PCR-Reaktion wird dazu ein großes Fragment des Plasmids amplifiziert, welches bis auf die zu deletierende Sequenz das gesamte Plasmid einschließlich der Vektorsequenz enthält. Die verwendeten Primer enthalten an den 3'-Enden eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease BamHI, sodaß die Enden des amplifizierten Fragments mit diesem Enzym geschnitten werden können. Die entstehenden kompatiblen Enden werden miteinander ligiert. Das entstehende Plasmid enthält ein Insert aus Phaseolin-Promotor und 5'-Ende der BWYV-cDNA, die über 6 Basenpaare (Bam HI-Ort) miteinander verbunden sind. Die 6 zusätzlichen Nukleotide werden mit Hilfe der in vitro Mutagenese deletiert und somit die exakte Verbindung zwischen Transkriptionsstart des Promotors und 5'-Ende der Virus-cDNA geschaffen.

Das resultierende Plasmid wird mit Eco RV und Sal I verdaut. Aus den Klonen GRN-GUS und GRN-BNG kann mit denselben Enzymen jeweils ein Fragment herausgetrennt werden, das BWYV-cDNA (außer dem 5'-Ende bis zum Eco RV-Ort) einschließlich des eingefügten GUS- bzw. 2S-Samenprotein-Gens und das nos-Polyadenylierungssignal enthält. Dieses Fragment wird in das

Eco RV / Sal I-geschnittene Plasmid einligiert. Es entsteht eine Expressionskassette aus Phaseolin-Promotor, mutierter BWYV-cDNA mit integriertem Fremdgen (GUS- oder Samenspeicherprotein-Gen) unter Kontrolle des subgenomischen viralen Promotors und einem nos-Polyadenylierungssignal. Die Expressionskassette läßt sich über die Einzelrestriktionsorte für Xba I und Kpn I ausschneiden und in einen Binärvektor (z.B. pGA 482) klonieren. Nach Transformation von Pflanzen wie unter Beispiel 2 beschrieben werden im Samen der Transformanten vom Phaseolin-Promotor Transkripte synthetisiert, welche sich durch den in Beispiel 1 erläuterten BWYV-Replikationsmechanismus replizieren. Die entstehenden Fremdgen-tragenden subgenomischen Messenger werden somit samenspezifisch in das gewünschte Proteinprodukt translatiert.

#### 4. Literatur:

P. Ahlquist, V. Luckow, P. Kaesberg (1981): Complete nucleotide sequence of brome mosaic virus RNA3. J. Mol. Biol., 153, pp. 23

P. Ahlquist, R.F. Pacha (1990): Gene amplification and expression by RNA viruses and potential for further application to plant gene transfer. Physiol. Plant., 79, pp. 163-167

J.G. Atabekov, Yu. L. Dorokhov (1984): Plant virus-specific transport function and resistance of plants to viruses. Adv. Virus Res., 29, pp. 313-364

N. Brisson, J. Paszkowski, J.R. Penswick, B. Gronenborn, L. Potrykus, T. Hohn (1984): Expression of a bacterial gene in plants by using a viral vector. Nature 310, pp. 511-514

S. Chapman, T. Kavanagh, D. Baulcombe (1992): Potato virus X as a vector for gene expression in plant. The Plant J., 2, pp. 549-557

J.W. Davies, J. Stanley (1989): Geminivirus genes and vectors. Trends Genet, 5, pp. 77-81

W.O. Dawson, D.J. Lewandowski, M.E. Hilf, P. Bubrick, A.J. Raffo, J.J. Shaw, G.L. Grantham, P.R. Desjardins (1989): A tobacco mosaic virus- hybrid expresses and losses an added gene. Virology, 172, pp. 285-292

C. Deom, M. Oliver, R.N. Beachy (1987): The 30 kD gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. Science, 237, pp. 389- 394

L. Dixon, T. Hohn (1984): Initiation of translation of the cauliflower mosaic virus genome from a polycistronic mRNA: evidence from deletion mutagenesis. EMBO J., 3, pp. 2731-2736

L. Dixon, T. Nyffenegger, G. Delley, J. Martinez-Izquierdo T. Hohn (1986): Evidence for replicative recombination in cauliflower mosaic virus. Virology, 150, pp. 463-468

V.V. Dolja, H.J. McBride, J.C. Carrington (1992): Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of  $\beta$ -glucuronidase into the viral polyprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, pp. 10208-10212

J. Donson, C.M. Kearney, M.E. Hilf, W.O. Dawson (1991): Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, pp. 7204-7208

P. Eteessami, J. Watts, J. Stanley (1988): Size reversion of African cassava mosaic virus coat protein gene deletion mutants during infection of Nicotiana benthamiana. J. Gen. Virol., 70, pp. 277-289

R. French, M. Janda, P. Ahlquist (1986): Bacterial gene inserted in an engineered RNA virus: Efficient expression



in monocotyledonous plant cells. *Science*, 231, pp. 1294-1297

J. Fütterer, J.M. Bonneville, T. Hohn (1990): Cauliflower mosaic virus as a gene expression vector for plants. *Physiol. Plant.*, 79, pp. 154- 157

W. Gardiner, G. Sunter, L. Brand, J.S. Elmer, S.G. Rogers, D.M. Bisaro (1988): Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: the coat protein is not required for systemic spread or symptom development. *EMBO J.*, 7, pp. 899-904

N. Grimsley, B. Hohn, T. Hohn, R. Walden (1986): Agroinfection an alternative route for viral infection of plants by using the Ti-plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, pp.3282-3286

B. Gronenborn (1987): The molecular biology of cauliflower mosaic virus and its application as a plant gene vector. In: Hohn T.; Schell, J. (eds.) *Plant DNA infectious agents*. Springer-Verlag, Vienna, p.1

L. Hanley-Bowdoin, J.S. Elmer, S.F. Rogers (1988): Transient expression of heterologous RNAs using tomato golden mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* 16, pp. 10511-10528

R.J. Hayes, R.H.A. Coutts, K.W. Buck (1988a): Agroinfection of *Nicotiana* spp. with cloned DNA of tomato golden mosaic virus. *J. Gen. Virol.*, 69, pp. 1487-1496

R.J. Hayes, R.H.A. Coutts, K.W. Buck (1989): Stability and expression of bacterial genes in replicating geminiviral vectors in plants. *Nucleic Acids Res.*, 17, pp. 2391-2403

R.J. Hayes, I.D.T. Petty, R.H.A. Coutts, K.W. Buck (1988b): Gene amplification and expression in plants by a replicating gemini virus vector. *Nature*, 334, pp.179-182

L. Herrera-Estrella, G. van den Broeck, R. Maenhaut, M. van Montagu, J. Schell, M. Timko, A. Cashmore (1984): Light-, inducible and chloroplast- associated expression of a chimeric gene introduced into *Nicotiana tabacum* using a Ti-plasmid vector. *Nature*, 310, pp. 115-120

A.J. Howarth, R.C. Gardner, J. Messing, R.J. Shepherd (1981): Nucleotide sequence of naturally occurring deletion mutants of cauliflower mosaic virus. *Virology*, 112, pp. 678-685

R. Hull (1985): Viruses as vectors for plant genes. In: Dodds, J.H. (ed.) *Plant genetic engineering*. Cambridge University Press, Cambridge, 95

R.L. Joshi, V. Joshi, D.W. Ow (1990): BSMV genome mediated expression of a foreign gene in dicot and monocot plant cells. *EMBO J.*, 9, pp. 2663-2669

R.L. Joshi, V. Joshi (1991): Strategies for expression of foreign genes in plants. Potential use of engineered viruses. *FEBS Lett.*, 291, pp. 1-8

I. Jupin, K. Richards, G. Jonard, H. Guilley, C.W.A. Pleij (1990): Mapping sequences required for productive replication of beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Virology*, 178, pp. 273-280

I. F. Kanievski, S. Thakur, L. Cosowsky, G. Sunter, C. Brough, D. Bisaro, P. Maliga (1992): Tobacco lines with high copy number of replicating recombinant geminivirus vectors after biolistic DNA delivery. *The Plant J.*, 2, pp. 457-463

R. Koenig, W. Burgermeister, H. Weich, W. Sebald, C. Kothe (1986): Uniform RNA-patterns of beet necrotic yellow vein virus in sugar beet roots but not in leaves from several plant species. *J. Gen. Virol.*, 67, pp. 2043-2046

S.G.Lazarowitz, A.K. Pinder, V.D. Damsteegt, S.G. Rogers (1989): Maize streak virus genes essential for systemic spread and symptom development. EMBO J., 8, pp. 1023-1032

D.D. Lefebvre, B.L. Miki, J.F. Laliberte (1987): Mammalian metallothionein functions in plants. Biotechnology, 5, pp. 1053-1056

R.-M. Leiser (1990): Möglichkeiten zur Nutzung der autokatalytischen RNA-Replikation von Pflanzenviren für die Expressionsoptimierung von Fremdgenen. Kulturpflanze, 38, pp. 81-90

V. Matzeit, S. Schaefer, M. Kammann, H.-J. Schalk, J. Schell, B. Gronenborn (1991): Wheat dwarf virus vectors replicate and express foreign genes in cells of monocotyledonous plants. Plant Cell, 3, pp. 247-258

J. Stanley, R. Townsend (1986): Infectious mutants of cassava latent virus generated in vivo from intact recombinant DNA clones containing single copies of the genome. Nucleic Acids Res., 14, pp. 5981-5988

G. Sunter, D.M. Bisaro (1991): Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. Virology, 180, pp. 416-419

N. Takamatsu, M. Ishikawa, T. Meshi, Y. Okada (1987): Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA. EMBO J., 6, pp. 307-311

N. Takamatsu, Y. Watanabe, H. Yanagi, T. Meshi, T. Shiba, Y. Okada (1990): Production of enkephalin in tobacco protoplasts using tobacco mosaic virus RNA vector. FEBS. Lett., 269, pp. 73-76

- 32 -

L. van Vloeten-Doting, J.F. Bol, B.J.C. Cornelissen (1985): Plant-virus- based vectors for gene transfer will be of limited use because of the high error frequency during viral RNA synthesis. Plant Mol. Biol., 4, pp. 323-326

C. van Dun, L. van Vloeten-Doting, J. Bol (1988): Expression of alfalfa mosaic virus cDNA 1 and 2 in transgenic tobacco plants. Virology, 163, pp. 572-578

A. Ward, P. Etessami, J. Stanley (1988): Expression of a bacterial gene in plant mediated by infectious geminivirus DNA. EMBO J., 7, pp. 1583- 1587

- 33 -

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Institut fuer Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
- (B) STRASSE: Corrensstrasse 3
- (C) ORT: Gatersleben
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 06466

(ii) ANMELDETITEL: Verfahren und Vektorkonstrukt und Rezipienten zur Expressionssteigerung von Transgenen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (v) GEGENWÄRTIGE ANMELDEDATEN:

ANMELDENUMMER: WO PCT/EP 94/01408

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: JA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GTTATCGTGA GCGAGAAATT GCATCAACTA AGG

33

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

ERSATZBLATT (REGEL 26)

- 34 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GTTATCCTGA GTACGTAATT GATCACCTAA GG

32

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: JA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CCACGACCGT ATTCATTAAC GATTTCGCGT ACG

33

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CCACGACCGT ATTCCTCGAG GATTTCGCGT ACG

33

P a t e n t a n s p r ü c h e

- 1) Ein Verfahren zur Expressionssteigerung von Transgenen, dadurch gekennzeichnet, daß die betreffende Sequenz oder die betreffenden Sequenzen, nachfolgend betreffende Sequenz genannt, nach Einbau in das Vektorkonstrukt in den vorzugsweise eukaryotischen Rezipientenorganismus transferiert und mindestens ein Teil dieser Sequenz transkribiert wird, wobei die entstehenden Transkripte durch ein vorzugsweise phytovirales RNA-Replikationssystem amplifiziert werden.
- 2) Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die betreffende Sequenz in das Kern- oder Organellengenom des Rezipienten integriert wird oder ohne Integration persistiert und dadurch nur transient exprimiert wird.
- 3) Ein Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Transkription von transferierten Sequenzen in der Rezipientenzelle durch einen konstitutiven oder regulierbaren Promotor, im zweiten Falle vorzugsweise gewebe- oder ontogenesespezifischen Promotor, gesteuert wird.
- 4) Ein Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die betreffende Sequenz in ein Vektorkonstrukt eingebaut wird, das für mindestens einen Teil der für die Amplifikation des Transkripts notwendigen Virusreplikase kodiert oder daß die Virusreplikase oder ein Teil von ihr von Sequenzen exprimiert wird, die im Kern- oder Organellengenom des Rezipienten integriert sind oder episomal persistieren oder durch natürliche oder künstliche Infektion zugeführt werden.
- 5) Ein Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1

bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Rezipienten eukaryotische Organismen, vorzugsweise Gefäßpflanzen, oder Gewebe oder Zellen von diesen dienen.

- 6) Ein Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der betreffenden Sequenz um ein proteinkodierendes Gen oder/und um eine nichtproteinkodierende Sequenz handelt, insbesondere solche, die für antisense RNA, Ribozyme, Competitorsequenzen oder Pseudoknots kodieren, wobei die betreffende Sequenz bezüglich des Rezipienten entweder homologer oder heterologer Herkunft sein kann.
- 7) Ein Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß eine Ver- selbständigung, d.h. unkontrollierte Ausbreitung der Transkripte ausgeschlossen wird, indem mindestens eine, für die Ausbreitung innerhalb eines mehrzelligen Wirtsorganismus oder zwischen verschiedenen Wirtsorganismen essentielle, viruskodierte Funktion auf dem verwendeten Konstrukt inaktiviert wird.
- 8) Ein Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das virale RNA-Amplifikationssystem von dem Genom eines RNA-Pflanzenvirus, vorzugsweise von dem Genom eines RNA-Pflanzenvirus mit Plus-Polarität abgeleitet wird.
- 9) Ein Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das virale RNA-Amplifikationssystem von dem Genom eines Luteovirus oder eines taxonomisch der Luteovirusgruppe nahestehenden Virus abgeleitet wird, insbesondere von dem Genom des beet western yellows virus oder beet mild yellowing virus oder potato leaf roll virus oder barley yellow dwarf virus oder bean leaf roll virus oder pea enation mosaic virus oder parsnip



yellow fleck virus oder anthriscus yellows virus oder carrot red leaf virus oder soybean dwarf virus oder groundnut rosette assistor virus oder cucurbit aphid-borne yellows virus.

- 10) Ein Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression des betreffenden Transgens im Verlauf der RNA-Amplifikation so erfolgt, daß die betreffende Sequenz entweder zumindest einem Teil der primär transkribierten Sequenz oder ihrem Komplementärstrang entspricht oder, daß der Expression der betreffenden Sequenz die Bildung einer entsprechenden subgenomischen RNA vorausgeht.
- 11) Vektorkonstrukte zur Verwendung in einem Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß sie zumindest einen vorzugsweise eukaryotischen Promotor enthalten, der die Transkription der transferierten Sequenz in der Rezipientenzelle steuert und daß sie Erkennungs- und Regulationssequenzen besitzen, die für die Interaktion zwischen dem bei der Transkription entstehenden RNA-Produkt und der Virusreplikase notwendig sind, und daß sie mindestens einen geeigneten Ort zur Insertion der betreffenden Sequenz enthalten.
- 12) Vektorkonstrukte gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Promotor um einen konstitutiven oder regulierbaren Promotor, im zweiten Falle vorzugsweise um einen gewebe- oder ontogenese-spezifischen Promotor handelt.
- 13) Vektorkonstrukte gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß der verwendete Promotor von der Sequenz eines Caulimovirus abgeleitet wurde, vorzugsweise von der des 35S-Promotors des cauliflower mosaic virus.

- 14) Vektorkonstrukte gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Promotor um einen samen-spezifischen Promotor, vorzugsweise Phaseolin-, Legumin-, oder USP-Promotor handelt.
- 15) Vektorkonstrukte gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen Promotor handelt, der durch eine Infektion oder durch Induktoren aktiver Prozesse der Krankheitsabwehr eingeschaltet werden kann, vorzugsweise um einen PR- Proteinpromotor.
- 16) Vektorkonstrukte gemäß mindestens einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich für mindestens einen Teil von Proteinen kodieren, die für die RNA-Replikation in der Rezipientenzelle notwendig oder förderlich sind, wobei es sich vorzugsweise um zumindest einen Bestandteil des Replikasekomplexes handelt.
- 17) Vektorkonstrukte gemäß mindestens einem der Ansprüche 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Teile des viralen RNA-Amplifikationssystems, die durch das Vektorkonstrukt beigesteuert werden, von dem Genom eines RNA-Pflanzenvirus, vorzugsweise von dem Genom eines RNA-Pflanzenvirus mit Plus-Polarität abgeleitet werden.
- 18) Vektorkonstrukte gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das virale RNA-Amplifikationssystem von dem Genom eines Luteovirus oder eines taxonomisch der Luteovirusgruppe nahestehenden Virus abgeleitet wird, insbesondere von dem Genom des beet western yellows virus oder beet mild yellowing virus oder potato leaf roll virus oder barley yellow dwarf virus oder bean leaf roll virus oder pea enation mosaic virus oder parsnip yellow fleck virus oder anthriscus yellows virus oder carrot red leaf virus oder soybean dwarf

virus oder groundnut rosette virus oder cucurbit aphid-borne yellows virus.

- 19) Vektorkonstrukte gemäß mindestens einem der Ansprüche 11 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertion der betreffenden Sequenz so erfolgt, daß sich ihre Kodierung auf zumindest einem Teil der primär transkribierten Sequenz oder deren Komplementärstrang befindet oder, daß ihre Expression durch einen viralen subgenomischen Promotor gesteuert wird.
- 20) Vektorkonstrukte gemäß mindestens einem der Ansprüche 11 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine, für die Ausbreitung innerhalb eines mehrzelligen Wirtsorganismus oder zwischen verschiedenen Wirtsorganismen essentielle, viruskodierte Funktion inaktiviert wird, wodurch eine Verselbständigung, d.h. unkontrollierte Ausbreitung der Transkripte ausgeschlossen wird.
- 21) Vektorkonstrukte zur Verwendung in einem Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß sie zur Komplementierung des RNA-Amplifikationssystems dienen, was dadurch erreicht wird, daß sie zumindest einen vorzugsweise eukaryotischen Promotor enthalten, der die Transkription der transferierten Sequenz in der Rezipientenzelle steuert, und daß sie für mindestens eines der Proteine kodieren, die für die RNA-Replikation in der Rezipientenzelle notwendig oder förderlich sind und die durch jene Vektorkonstrukte entsprechend zumindest einem der Ansprüche 11 bis 16 nicht kodiert werden, wobei es sich bei den betreffenden Proteinen vorzugsweise um zumindest einen Bestandteil des Replikasekomplexes handelt.
- 22) Vektorkonstrukte gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Promotor um einen kon-

stitutiven oder regulierbaren Promotor, im zweiten Falle vorzugsweise um einen gewebe- oder ontogenese-spezifischen Promotor handelt.

- 23) Vektorkonstrukte gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Promotor um einen Promotor eines caulimovirus, vorzugsweise um den 35S-Promotor des cauliflower mosaic virus handelt
- 24) Vektorkonstrukte gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Promotor um einen samen-spezifischen Promotor, vorzugsweise Phaseolin-, Legumin-, oder USP-Promotor handelt.
- 25) Vektorkonstrukte gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Promotor um einen Promotor handelt, der durch eine Infektion oder durch Induktoren aktiver Prozesse der Krankheitsabwehr, vorzugsweise Resistenzinduktoren, eingeschaltet werden kann, vorzugsweise PR-Protein-Induktoren.
- 26) Vektorkonstrukte gemäß mindestens einem der Ansprüche 21 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Teile des viralen RNA-Amplifikationssystems, die durch das Vektorkonstrukt beigesteuert werden, von dem Genom eines RNA-Pflanzenvirus, vorzugsweise von dem Genom eines RNA-Pflanzenvirus mit Plus-Polarität abgeleitet werden.
- 27) Vektorkonstrukte gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das virale RNA-Amplifikationssystem von dem Genom eines Luteovirus oder eines taxonomisch der Luteovirusgruppe nahestehenden Virus abgeleitet wird, insbesondere von dem Genom des beet western yellows virus oder beet mild yellowing virus oder potato leaf roll virus oder barley yellow dwarf virus oder bean leaf roll virus oder pea enation mosaic virus oder

parsnip yellow fleck virus oder anthriscus yellows virus oder carrot red leaf virus oder soybean dwarf virus oder groundnut rosette virus oder cucurbit aphid-borne yellows virus.

- 28) Vektorkonstrukte gemäß mindestens einem der Ansprüche 21 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertion der betreffenden Sequenz so erfolgt, daß sich ihre Kodierung auf entweder zumindest einem Teil der primär transkribierten Sequenz oder deren Komplementärstrang befindet oder, daß ihre Expression durch einen viralen subgenomischen Promotor gesteuert wird.
- 29) Vektorkonstrukte gemäß mindestens einem der Ansprüche 21 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine, für die Ausbreitung innerhalb eines mehrzelligen Wirtsorganismus oder zwischen verschiedenen Wirtsorganismen essentielle, viruskodierte Funktion inaktiviert wird, wodurch eine Verselbständigung, d.h. unkontrollierte Ausbreitung der Transkripte ausgeschlossen wird.
- 30) Eukaryotische Organismen, vorzugsweise Gefäßpflanzen, oder Gewebe oder Zellen von diesen zur Verwendung in einem Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß sie zumindest Teile der auf einem der Vektorkonstrukte gemäß mindestens einem der Ansprüche 21 bis 29 kodierten Funktionen exprimieren.
- 31) Verwendung des Verfahrens und der Vektorkonstrukte gemäß Anspruch 1 und mindestens einem der Ansprüche 2 bis 30 zur Expressionssteigerung von Transgenen, um bestimmte Eigenschaften des Rezipienten im Sinne seiner "Verbesserung" zielgerichtet zu verändern oder um den Rezipienten zur Herstellung fremder Produkte auszunutzen.

- 32) Verwendung des Verfahrens und der Vektorkonstrukte gemäß Anspruch 31, um die Qualität von Samenspeicherproteinen zu verbessern, indem man vorzugsweise die Aminosäurezusammensetzung des Gesamtsamenproteins verändert durch die Hochexpression von in der kodierenden Sequenz veränderten oder heterologen Samenproteingenen in transgenen Pflanzen.
- 33) Verwendung des Verfahrens und der Vektorkonstrukte gemäß Anspruch 31, um die Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gegenüber biotischen Schadfaktoren zu erhöhen durch Hochexpression von vorzugsweise Resistenzgenen oder pathogenabgeleiteten Sequenzen.
- 34) Verwendung des Verfahrens und der Vektorkonstrukte gemäß Anspruch 31, um in eukaryotische Organismen, vorzugsweise Gefäßpflanzen, oder Geweben oder Zellen von diesen wirtschaftlich interessante proteinogene Produkte herzustellen, vorzugsweise medizinisch relevante Proteine.

## Legende der Figur 2

## Abbildung 2:

Originalsequenz des antisense-strangs der Virus cDNA um das ATG-Kodon von ORF I (A.I) und von ORF IV (B.I.) und die Sequenz der zur Mutagenese verwendeten Oligonukleotide (A. II. und B. II.).

1 / 2

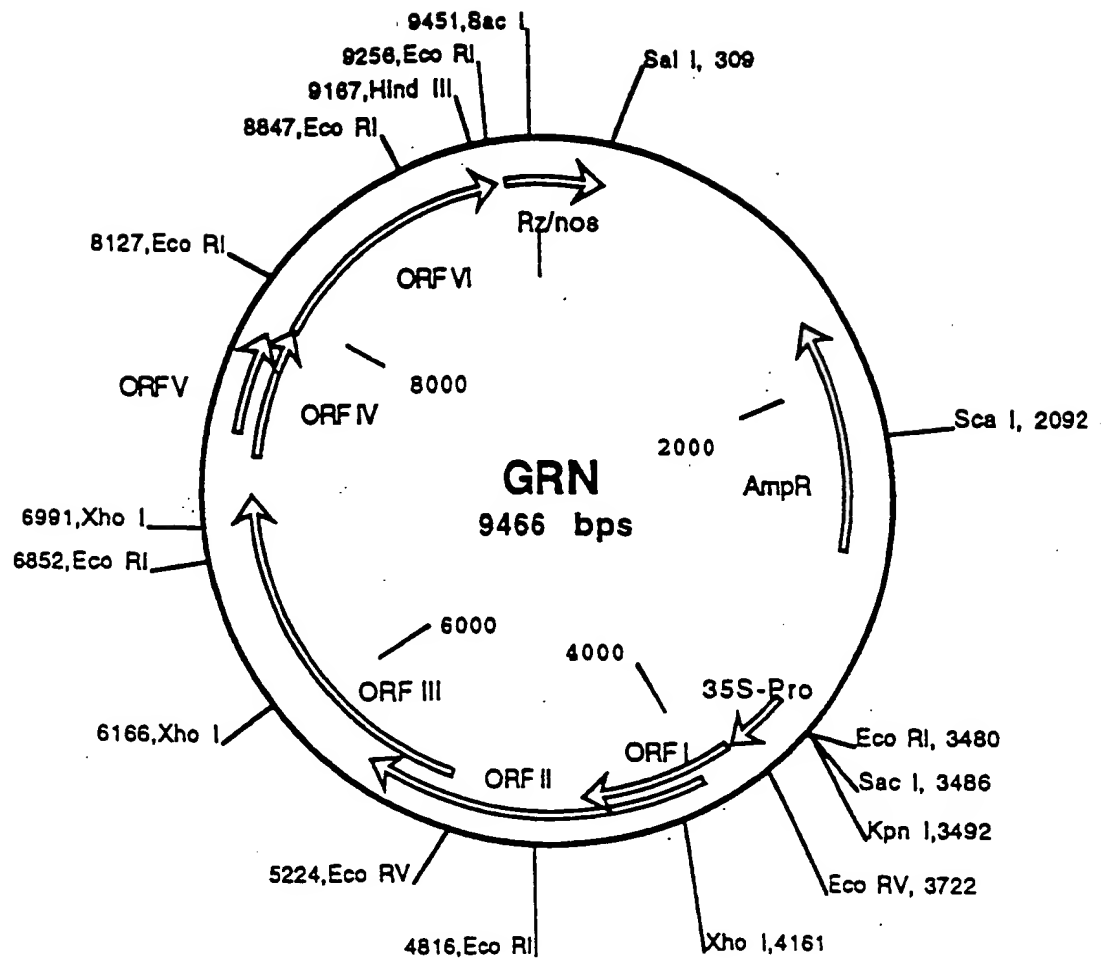


Abbildung 1



2 / 2

A. I. 5' ... GTTATCGTGAGCGAGAAATTGCATCAACTAAG... 3'  
\*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*  
II. 5' ... GTTATCCTGAGTACGTAATTG-ATCACCCTAAG... 3'

Sna BI

B. I. 5' ... CCACGACCGTATTTCATTACGATTTCGCGTACG... 3'  
\*\*\*\*\* \* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*  
II. 5' ... CCACGACCGTATTTCCTCGAGGATTTCGCGTACG... 3'

Xho I

Abbildung 2

ERSATZBLATT (REGEL 26)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 94/01408

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 5 C12N15/82 C12N15/83 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,91 13994 (CSIRO) 19 September 1991  see the whole document ---	1-8, 10-13, 15,17, 19,20, 31,33,34
X	EP,A,0 425 004 (SOLVAY) 2 May 1991  see the whole document ---  -/--	1-8, 10-12, 17-26, 28,29, 31,33,34

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 October 1994

Date of mailing of the international search report

28.10.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 94/01408

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AU,B,7 195 191 (NIHON NOHYAKU) 12 March 1992  see the whole document ---	1-8, 10-13, 17, 19-23, 26, 28-31, 33,34
X	EP,A,0 479 180 (HOECHST) 8 April 1992  see the whole document ---	1-8, 10-13, 17,19, 20,33
X	EP,A,0 412 006 (PGS) 6 February 1991  see page 6, line 9 - line 24 ---	1-8, 10-13, 17, 19-22, 28-30
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 113, no. 14, 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 122723, JUN, W. 'Preparation of transgenic plants for control of virosis' see abstract & CN,A,1 033 645 (CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 5 July 1989 ---	1-8, 10-13, 17,19,33
X	STADLER GENETICS SYMPOSIA SERIES: GENE MANIPULATION IN PLANT IMPROVEMENT, II, 1990 pages 313 - 330 YOUNG, M., ET AL. 'Using plant virus and related RNA sequences to control gene expression' see page 318, paragraph 2 - page 319 ---	1-8, 10-13, 17,19,20
X	WO,A,89 08145 (BIOSOURCE GENETICS) 8 September 1989 see example 51 ---	21-23, 28-30
P,X	EP,A,0 573 767 (NIHON NOHYAKU) 15 December 1993  see the whole document ---  -/--	1-8, 10-13, 17, 19-23, 26, 28-31, 33,34

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International      lication No  
PCT/EP 94/01408

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol.89, October 1992, WASHINGTON US pages 9136 - 9140 LEISER, R.-M., ET AL. 'Agroinfection sa an alternative to insects for infecting plants with beet western yellows luteovirus' see the whole document ---</p>	1-34
A	<p>EP,A,0 298 918 (CIBA-GEIGY) 11 January 1989 see the whole document ---</p>	1-34
E	<p>WO,A,94 16089 (BIOSOURCE GENETICS) 21 July 1994  see the whole document -----</p>	1-8, 10-13, 17,19, 31,32

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 94/01408

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9113994	19-09-91	NONE	
EP-A-0425004	02-05-91	NL-A- 8902452 NL-A- 9001711 CA-A- 2026703 JP-A- 3280883	01-05-91 01-05-91 04-04-91 11-12-91
AU-B-7195191		NONE	
EP-A-0479180	08-04-92	CA-A- 2052808 JP-A- 5260971	06-04-92 12-10-93
EP-A-0412006	06-02-91	AU-A- 6273390 WO-A- 9102068	11-03-91 21-02-91
CN-A-1033645		NONE	
WO-A-8908145	08-09-89	AU-B- 638411 AU-A- 4072589 EP-A- 0406267 JP-T- 3502886 US-A- 5316931	01-07-93 22-09-89 09-01-91 04-07-91 31-05-94
EP-A-0573767	15-12-93	AU-B- 3824893 JP-A- 6046874	04-11-93 22-02-94
EP-A-0298918	11-01-89	AU-B- 620039 JP-A- 1037294	13-02-92 07-02-89
WO-A-9416089	21-07-94	NONE	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Zeichen

PCT/EP 94/01408

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 5 C12N15/82 C12N15/83 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 5 C12N A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,91 13994 (CSIRO) 19. September 1991  siehe das ganze Dokument ---	1-8, 10-13, 15,17, 19,20, 31,33,34
X	EP,A,0 425 004 (SOLVAY) 2. Mai 1991  siehe das ganze Dokument ---	1-8, 10-12, 17-26, 28,29, 31,33,34

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Oktober 1994

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28. 10. 94

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Maddox, A

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

International Patente  
PCT/EP 94/01408

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	AU,B,7 195 191 (NIHON NOHYAKU) 12. März 1992  siehe das ganze Dokument ---	1-8, 10-13, 17, 19-23, 26, 28-31, 33,34
X	EP,A,0 479 180 (HOECHST) 8. April 1992  siehe das ganze Dokument ---	1-8, 10-13, 17,19, 20,33
X	EP,A,0 412 006 (PGS) 6. Februar 1991  siehe Seite 6, Zeile 9 - Zeile 24 ---	1-8, 10-13, 17, 19-22, 28-30
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 113, no. 14, 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 122723, JUN, W. 'Preparation of transgenic plants for control of virosis' siehe Zusammenfassung & CN,A,1 033 645 (CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 5. Juli 1989 ---	1-8, 10-13, 17,19,33
X	STADLER GENETICS SYMPOSIA SERIES: GENE MANIPULATION IN PLANT IMPROVEMENT, II, 1990 Seiten 313 - 330 YOUNG, M., ET AL. 'Using plant virus and related RNA sequences to control gene expression' siehe Seite 318, Absatz 2 - Seite 319 ---	1-8, 10-13, 17,19,20
X	WO,A,89 08145 (BIOSOURCE GENETICS) 8. September 1989 siehe Beispiel 51 ---	21-23, 28-30
P,X	EP,A,0 573 767 (NIHON NOHYAKU) 15. Dezember 1993  siehe das ganze Dokument ---	1-8, 10-13, 17, 19-23, 26, 28-31, 33,34

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd.89, Oktober 1992, WASHINGTON US Seiten 9136 - 9140 LEISER, R.-M., ET AL. 'Agroinfection sa an alternative to insects for infecting plants with beet western yellows luteovirus' siehe das ganze Dokument ---	1-34
A	EP,A,0 298 918 (CIBA-GEIGY) 11. Januar 1989 siehe das ganze Dokument ---	1-34
E	WO,A,94 16089 (BIOSOURCE GENETICS) 21. Juli 1994  siehe das ganze Dokument -----	1-8, 10-13, 17,19, 31,32



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

International ☐ Zeichen

PCT/EP 94/01408

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9113994	19-09-91	KEINE	
EP-A-0425004	02-05-91	NL-A- 8902452	01-05-91
		NL-A- 9001711	01-05-91
		CA-A- 2026703	04-04-91
		JP-A- 3280883	11-12-91
AU-B-7195191		KEINE	
EP-A-0479180	08-04-92	CA-A- 2052808	06-04-92
		JP-A- 5260971	12-10-93
EP-A-0412006	06-02-91	AU-A- 6273390	11-03-91
		WO-A- 9102068	21-02-91
CN-A-1033645		KEINE	
WO-A-8908145	08-09-89	AU-B- 638411	01-07-93
		AU-A- 4072589	22-09-89
		EP-A- 0406267	09-01-91
		JP-T- 3502886	04-07-91
		US-A- 5316931	31-05-94
EP-A-0573767	15-12-93	AU-B- 3824893	04-11-93
		JP-A- 6046874	22-02-94
EP-A-0298918	11-01-89	AU-B- 620039	13-02-92
		JP-A- 1037294	07-02-89
WO-A-9416089	21-07-94	KEINE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)